

دست‌ورزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از سیستم بیانی آدنو ویروس حاوی ژن حفاظت‌کننده سلولی NRF2

محمد محمدزاده^۱، راحله حلبیان^۲، مهشید محمدی‌پور^۳، علی اصغر کیانی^۴، احمد قره‌باغیان^۵،
ناصر امیری‌زاده^۶، مهریار حبیبی رودکنار^۷

چکیده

سابقه و هدف

مهم‌ترین مساله در پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC)، بقای پایین پس از پیوند می‌باشد. دست‌ورزی ژنتیکی آن‌ها، یک استراتژی در جهت حفاظت سلولی علیه آسیب‌های محیطی است. حفظ خاصیت تمایزی این سلول‌ها پس از دست‌کاری، مهم می‌باشد. در این مطالعه توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از دست‌ورزی با NRF2 بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان جداسازی شد. ژن NRF2 با روش TOPoCloning به وکتور pENTR وارد شد. با استفاده از تکنولوژی gateway، ژن NRF2، به وکتور pAd/CMV/V5-DEST انتقال یافت. آدنوویروس نو ترکیب در سلول‌های AD293 تولید، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به آن‌ها آلوده و بیان NRF2 توسط RT-PCR تایید شد. پس از مواجهه سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با NRF2 با شرایط استرسی، میزان بقا و آپوپتوز سلولی آن‌ها ارزیابی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان‌کننده NRF2 به رده استخوان و چربی بررسی شد.

یافته‌ها

ژن NRF2 به طور موفقیت‌آمیزی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان شد. تمایز NRF2-MSC ها به رده‌های استخوانی و چربی، نشان می‌دهد افزایش بیان NRF2، خصوصیت تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تغییر نمی‌دهد.

نتیجه‌گیری

بیان NRF2، فاکتور به خوبی شناخته شده حفاظت سلولی، با استفاده از سیستم بیانی آدنو ویروس، با ظرفیت تمایزی آن‌ها تداخل نمی‌کند. NRF2-MSC ها ممکن است در آینده جهت استفاده در سلول درمانی براساس سلول بنیادی قابل استفاده باشند.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی، پروتئین Nrf2، TOPO

تاریخ دریافت: ۱۹/۱۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۱۴

- ۱- دانشجوی PhD هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۲- دانشجوی PhD بیوتکنولوژی پزشکی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۳- دانشجوی PhD ژنتیک مولکولی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۴- دانشجوی PhD هماتولوژی و بانک خون - مربی دانشگاه علوم پزشکی لرستان - خرم‌آباد - ایران
- ۵- PhD ایمونوهما‌تولوژی بالینی - دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران
- ۶- PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۷- مؤلف مسئول: PhD بیوتکنولوژی پزشکی - دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC)، گروهی از سلول‌های کلونی‌زا و پرتوان هستند که می‌توانند به رده‌های مختلفی از جمله استخوان، چربی، آستروسیت، عصب، سلول‌های عضله قلبی و اسکلتی و سایر انواع تمایز یابند (۱-۴).

امروزه به دلیل جداسازی آسان و توانایی تمایز وسیعی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارند، کاربردهای مختلفی در پزشکی به دست آورده‌اند. در بسیاری از بیماری‌های بدخیم مانند انواع لوسمی‌ها و بیماری‌های ژنتیکی و مادرزادی، استفاده از سلول‌های بنیادی روش درمانی نوینی است به طوری که پیوند سلول‌های بنیادی، راه‌کار مناسبی برای درمان این گونه از بیماری‌ها به شمار می‌رود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) با توانایی تمایز به رده‌های مختلف، توانایی فرار از سیستم ایمنی میزبان، خاصیت تعدیل ایمنی و سهولت تکثیر آن‌ها در محیط کشت، سلول‌های ایده‌آلی برای استفاده در سلول درمانی می‌باشد. به طوری که امروزه پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان آسیب‌های بافتی هم چون انفارکتوس میوکارد، آسیب حاد کلیوی، پیوند کبدی و سایر انواع بیماری‌ها بسیار مؤثر می‌باشد (۵-۷).

برای استفاده بالینی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نیاز به دسترسی به تعداد زیادی از سلول‌های صلاحیت‌دار از نظر عملکرد با فنوتیپ و ژنوتیپ پایدار است ولی طی فرآیندهای جمع‌آوری، کشت و پرورش، آسیب‌های متعددی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی وارد می‌شود که بقا و عملکرد آن‌ها را در بدن کاهش می‌دهد. به عنوان مثال یک روز پس از پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی به قلبی که دچار انفارکتوس شده است؛ کمتر از ۱٪ سلول‌های پیوند شده زنده باقی می‌مانند. از طرف دیگر افرادی که گیرنده سلول‌های بنیادی می‌باشند، بنا به دلایل مختلف (شیمی درمانی، پرتو درمانی، التهاب و ...) دارای محیط توکسیک و شرایط اکسیداتیو استرس هستند که به نوبه خود می‌تواند باعث کاهش بقای سلول‌های بنیادی متعاقب پیوند شود (۸).

اگر استراتژی به کار برده شود که این سلول‌ها به

آسیب‌های وارده مقاوم شوند به طوری که حدود دو یا چند روز بیشتر زنده بمانند، می‌توان این انتظار را داشت که درصد موفقیت پیوند سلول بنیادی مزانشیمی بسیار بالا باشد.

یکی از راه‌کارها، دست‌ورزی مهندسی ژنتیک این سلول‌ها با استفاده از عوامل محافظت‌کننده سلولی مانند آنزیم NRF2 می‌باشد. پروتئین NRF2 یک فاکتور نسخه‌برداری محافظت‌کننده سلولی (cytoprotective) است که در برابر استرس‌های مختلف، موجب بقای سلولی می‌شود. NRF2 به طور طبیعی بیان و به پروتئین‌های سیتوپلاسمی متصل می‌شود و در اثر استرس‌های گوناگون، به هسته سلول رفته و موجب بیان ژن‌های متعددی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، آنزیم‌های سم‌زدایی‌کننده، ژن‌های پردازش دارو و ... می‌شود. NRF2 و پروتئین‌های حاصل از آن، نقش مهمی در حفاظت علیه استرس‌های اکسیداتیو، آسیب سلولی ناشی از مواد شیمیایی، حفاظت از تشکیل سرطان و ترمیم زخم دارند (۹-۱۳).

چون بیان دایمی ژن از جمله NRF2 در MSC مجاز نمی‌باشد، از این رو در این تحقیق رده سلول بنیادی مزانشیمی با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک دست‌ورزی شده به طوری که ژن NRF2 بتواند در این رده سلولی به طور کارا و مؤثر و موقتی بیان شود.

در این مطالعه از وکتور آدنو ویروس به منظور انتقال ژن NRF2 به سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شده است. دلیل انتخاب این وکتور و مزایای استفاده از آن، آلوده‌سازی تعداد زیادی از سلول‌ها، بیان بالا، بیان موقت، تغییرات پس از ترجمه‌ای مناسب و ... می‌باشد (۱۴).

همان طوری که گفته شد، مهم‌ترین ویژگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی که باعث شده است این سلول‌ها اهمیت ویژه‌ای را در سلول درمانی داشته باشند، توانایی تمایز آن‌ها به رده‌های سلولی مختلف است. اما در صورت دست‌ورزی ژنتیکی این سلول‌ها، این نگرانی وجود دارد که خاصیت تمایزی آن‌ها کاهش یافته و یا از بین برود. در این مطالعه ابتدا از اثر حفاظت‌کنندگی NRF2 با سیستم بیانی آدنو ویروس استفاده شد و سپس ویژگی این سلول‌ها در تمایز به دو سیستم چربی و استخوان مورد مطالعه قرار

گرفت.

مزانشیمی به مدت ۱ ساعت با (سیگما) ۵ mm H₂O₂ انکوبه شدند. سپس با استفاده از ترایزول (روش، tripure isolation reagent)، RNA سلول‌ها استخراج و با استفاده از دستگاه نانودراپ غلظت آن مشخص گردید. طبق دستورالعمل کیت cDNA synthesis (اینویترژن)، cDNA این سلول‌ها ساخته شد. با استفاده از آغازگرهای بالادست (Forward NRF2)، 5-CAC CAT GGG AAT GGA CTT، و پایین دست (Reverse NRF2)، 5-GGA GCT GCC-3 CTA GTT TTT CTT AAC ATC TGG CTT CTT AC-3 و با استفاده از آنزیم DNA Pfu پلیمرز (فرمتاز)، ژن NRF2 جدا گردید. در مرحله بعد به منظور کلونینگ ژن NRF2 در وکتور pENTR/TEV/D-TOPO، از کیت pENTR Directional TOPO Cloning (اینویترژن) مطابق دستورالعمل آن استفاده گردید. در طی این عمل، ژن NRF2 جدا شده، وارد وکتور pENTR گردید.

تکنولوژی gateway و ساخت آدنو ویروس نوترکیب: در تکنولوژی gateway توسط آنزیم LR ClonaseII (اینویترژن)، ژن NRF2 از وکتور pENTR وارد وکتور pAd/CMV/V5-DEST (اینویترژن) می‌گردد و وکتور pAd/CMV/V5-NRF2 تهیه می‌شود. در مرحله بعد توسط آنزیم اندونوکلاز Pac1، سازه ژنی آدنو ویروس نوترکیب pAd/CMV/V5-NRF2 به همراه کنترل pAd/CMV/V5-DEST خطی، آماده ترانسفکته به سلول‌های AD293 گردیدند. به منظور ترانسفکشن از فیوژن ۶ (روش) استفاده گردید. در این سلول‌ها، آدنو ویروس‌های نوترکیب محتوی NRF2 و نیز آدنو ویروس‌های خالی به عنوان کنترل تولید شدند که جهت آلوده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار رفتند.

بررسی بیان موقت NRF2:

به منظور بررسی بیان موقت NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس در سطح RNA، از واکنش RT-PCR استفاده شد. جهت استخراج RNA سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس‌های نوترکیب، محتوی NRF2 در روزهای مختلف،

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده، از نوع تجربی بود. تعداد نمونه ۳ عدد بوده و آزمایش‌ها ۳ مرتبه تکرار شده‌اند. از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاساژ ۴ جهت انجام آزمایش‌ها استفاده شده است.

جداسازی، کشت و تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

ابتدا طی مطالعه‌های انجام شده و بررسی شرایط سلامت‌دهنده، در مرکز پیوند بیمارستان شریعتی با اخذ رضایت‌نامه کتبی، نمونه خون مغز استخوان تهیه گردید. پس از سانتریفوژ شیب غلظتی با استفاده از محلول فایکول هاپیک (Ficoll/Hypaque, Stem Cell)، سلول‌های تک هسته‌ای جداسازی و در محیط کشت DMEM Low glucose (اینویترژن) حاوی ۱۰ درصد FBS (Stem Cell) کشت داده شدند. هر ۳ روز مایع رویی تعویض گردید، به این شکل سلول‌های بنیادی مزانشیمی که خاصیت چسبندگی به کف فلاسک را دارند از سایر انواع سلول‌ها جدا می‌شوند. مورفولوژی مخصوص این سلول‌ها و وجود شاخص‌های مخصوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از فلوسیتومتری به منظور تعیین هویت آن‌ها به کار رفت. به منظور تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از فلوسیتومتری، بیان شاخص‌های مختص این رده، CD105، CD90، CD73 و CD166 و عدم بیان مارکرهای سایر رده‌های سلولی مانند CD14، CD34 و CD45 ارزیابی شد. پس از کشت سلول و گذشت زمان لازم، سلول‌ها با تریپسین جدا شده و با یکی از آنتی‌بادی‌های فوق به همراه آنتی CD105 انکوبه و سپس با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل گردیدند. برای هر یک از آنتی‌بادی‌های فوق از آنتی‌بادی کنترل منفی ایزوتیپ مخصوص خود نیز استفاده شد.

جداسازی و کلونینگ NRF2:

به منظور القای بیان ژن NRF2، سلول‌های بنیادی

میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده چربی؛
کیت تمایز STEMPro Adipogenesis (اینویترژن، جیبکو) جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از آلوده شدن با آدنو ویروس‌های نوترکیب محتوی NRF2 و با آدنو ویروس‌های خالی به کار رفت. پس از ۷ روز، رنگ‌آمیزی HCS LipidTOX™ Green Neutral Lipid (اینویترژن) به منظور مشخص نمودن میزان تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده چربی توسط میکروسکوپ فلورسانت استفاده شد.

ارزیابی آپوپتوز سلولی با استفاده از آنکسین V:

آپوپتوز سلول‌های NRF2-MSD تحت شرایط استرس با استفاده از کیت آنکسین V (رُوش، آلمان (Diagnostics مطابق دستورالعمل سازنده اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه ۲۰۰ هزار سلول بنیادی مزانشیمی پس از آلوده شدن با آدنو ویروس‌های دارای ژن NRF2 تحت تاثیر استرس‌های مختلف قرار گرفتند و سپس با استفاده از تریپسین جدا و دو مرتبه با استفاده از بافر PBS شسته شدند و پس از انکوباسیون در بافر محتوی آنکسین V به مدت ۱۵ دقیقه، با استفاده از دستگاه فلوئوسیتومتری (partec) و نرم‌افزار flomax آنالیز شدند.

سنجش درصد بقای سلولی با استفاده از آزمون MTT:

به منظور انجام این آزمون، ابتدا تعداد بیست هزار سلول در هر خانه از خانه‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها در معرض استرس‌های مختلف قرار گرفتند. پس از ارایه استرس‌ها به مدت‌های زمانی مختلف، سلول‌ها به مدت ۴ ساعت با ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT ۵ mg/mL (Dimethylthiazol - 2 - 4, 5 - (سیگما، 5-yl - 2 - [diphenyltetrazolium bromide]) (سیگما، دوسلدورف - آلمان)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. واکنش با افزودن SDS ۱۰٪ و ۰/۱ مول HCl متوقف گردید. پس از حل نمودن کریستال‌ها در DMSO، میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

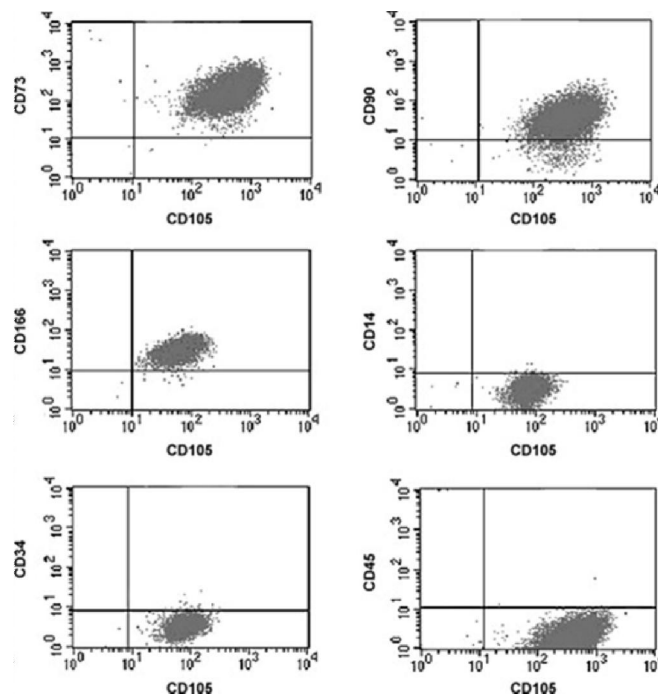
همانند قبل، از ترایزول استفاده شد. سپس با استفاده از کیت cDNA synthesis (اینویترژن)، cDNA این سلول‌ها ساخته شد و واکنش PCR به منظور بررسی بیان NRF2 صورت گرفت. برای این منظور از آغازگرهای داخلی NRF2 (آغازگر بالادست 5-GCG ACG GAA AGA GTA -3 GTT GGC دست پایین و آغازگر بتا اکتین (آغازگر بالادست 5-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG G-3 GTG TTG AAG GTC TCA AAC ATG دست پایین و primer3 طراحی شدند، استفاده گردید. هم‌چنین بیان NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس خالی نیز با استفاده از آغازگرهای مذکور سنجیده شد.

بررسی بیان پروتئین NRF2:

آزمایش وسترن بلات به منظور بررسی میزان بیان NRF2 در سطح پروتئین انجام گردید. در این راستا، پروتئین توتال به وسیله معرف Lysis M (رُوش، آلمان، Diagnostics) برطبق دستورالعمل از MSCs آلوده شده با آدنو ویروس نوترکیب استخراج شد و با استفاده از روش SDS-PAGE، نمونه استخراجی پس از طی مراحل لازم بر روی ژل پلی‌آکریلامید الکتروفورز شد و از طریق روش وسترن بلات، به غشای PVDF (رُوش، آلمان Diagnostics) انتقال یافت و در پایان با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال NRF2 (سانتاکروز، بیوتکنولوژی)، بیان پروتئین NRF2 آنالیز گردید. از اندازه‌گیری بیان پروتئین بتا اکتین به عنوان کنترل استفاده شد.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده استخوانی:

به منظور تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس‌های نوترکیب محتوی NRF2، از کیت تمایز STEMPro Osteogenesis (اینویترژن، جیبکو) استفاده شد. به مدت ۲۱ روز، محیط تمایز هر ۳-۴ روز یک بار تعویض شد. بعد از این مدت به منظور بررسی تمایز سلول‌ها، رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی آلزارین رد (Chemicon) انجام گرفت. سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با



شکل ۱: بررسی مارکرهاي اختصاصي سلول‌هاي بنيادي مزانشيمي. در اين شکل بيان مارکرهاي مختلف سطح سلولي در برابر مارکر مختص سلول‌هاي بنيادي مزانشيمي CD 105 ارزيابي شده است. همان طوري که انتظار داشتيم اين سلول‌ها مارکرهاي اختصاصي سلول‌هاي بنيادي مزانشيمي CD105، CD90، CD73 و CD166 را بيان مي‌کنند ولي از نظر مارکرهاي ساير سلول‌ها مانند CD14، CD34 و CD45 منفي مي‌باشند.

کننده سلول‌هاي مزانشيمي بود (شکل ۱).

يافته‌ها

پس از جداسازي سلول‌ها و کشت در محيط کشت اختصاصي، سلول‌هاي رشد کرده از لحاظ مورفولوژي مورد بررسي قرار گرفتند. به تدريج با تعويض محيط کشت اختصاصي سلول‌هاي بنيادي مزانشيمي، ساير انواع سلول‌هاي موجود در مغز استخوان که خاصيت اتصال به کف فلاسک را ندارند حذف گرديدند. مشاهده ميكروسکوپي نشان داد که سلول‌هاي جدا شده از لحاظ مورفولوژي مشابه سلول‌هاي بنيادي مزانشيمي مي‌باشند.

تايبید حضور مارکرهاي سطحي اختصاصي سلول‌هاي بنيادي مزانشيمي با استفاده از آنتي‌بادي اختصاصي و دستگاه فلوسايتومتري.

پس از مشاهده ميكروسکوپي، حضور آنتي‌ژن‌هاي موجود در سطح سلول‌ها مورد بررسي قرار گرفت. وجود مارکرهاي سطحي CD105، CD166، CD90، CD37 و عدم حضور مارکرهاي CD34، CD14 و CD45، تايبید

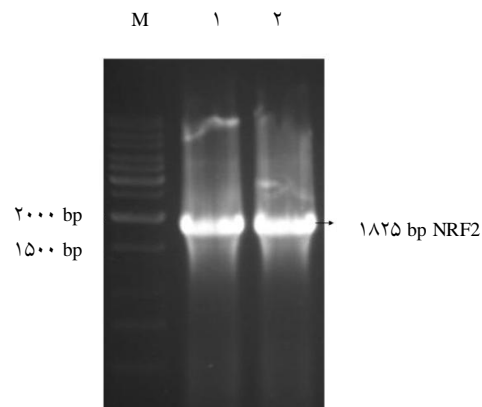
ساخت cDNA و جداسازي ژن NRF2: براي جداسازي ژن NRF2 لازم بود ابتدا cDNA کل سلولي ساخته و سپس cDNA ژن مورد نظر از مجموعه جدا گردد، براي اين منظور در ابتدا از روش RT-PCR براي ساخت cDNA کل سلول استفاده شد. با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژن و آغازگراي طراحي شده، انتظار مي‌رفت ژن NRF2 پس از القاي سلول‌ها با H_2O_2 طی واکنش‌هاي زنجيره‌اي پليمرز (PCR) جدا شود. در طراحي آغازگر سعی شد تا علاوه بر اختصاصي بودن براي ژن، داراي چهار نوکلئوتيد ويژه واکنش توپوکلونينگ نيز باشد. پس از اتمام فرآيند، محصول PCR با الکتروفورز آناليز گرديد، نتيجه ايجاد باندها ۱۸۲۵ bp بود که با طول قطعه ژن موجود در بانک ژني مطابقت داشت (شکل ۲). در تمام نمونه‌هاي تيماي شده با H_2O_2 اين باندها مشاهده شد.

جداسازی باشند.

از کلونی‌های رشد کرده در محیط کشت اختصاصی، استخراج پلاسمید به عمل آمد. از ۱۳ کلونی مورد بررسی، پس از الکتروفرز آن‌ها، ۱۱ کلونی سنگین‌تر بودند که می‌توانست نشان‌دهنده حضور ژن NRF2 در کلونی‌ها باشد و ۲ کلون دیگر حاوی وکتور خالی بودند (شکل ۳). یکی از کلونی‌ها (شماره ۱) برای مراحل بعدی آنالیز مورد استفاده قرار گرفت. برای تایید نهایی، ناقل توپوکلونینگ تعیین توالی شد که نتیجه آن حضور ژن در پلاسمید و قرار گرفتن آن در قالب صحیح را اثبات کرد. توالی حاصل به منظور ثبت به شرکت NCBI فرستاده شد که با کد HM446346 در بانک ژن به نام مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ثبت شد.

بررسی واکنش LR و ایجاد کلون‌های نوترکیب حاوی وکتور بیانی نوترکیب (gateway) و تایید نوترکیبی توسط محیط کشت انتخابی:

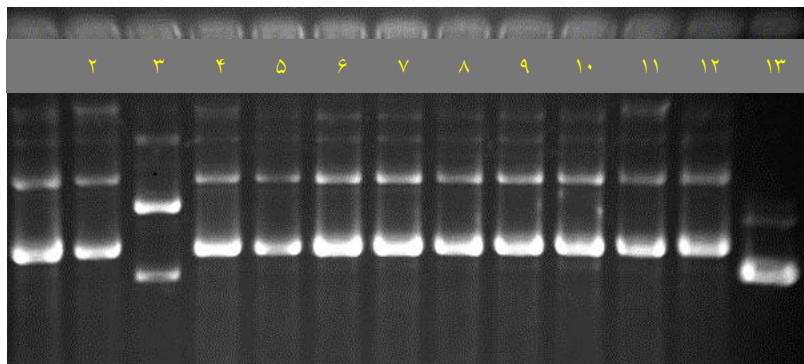
وکتور pAd/CMV/V5 در ناحیه نوترکیبی خود در بین دو جایگاه نوترکیبی attR1 & attR2، دارای بخش ژنی Cm^R (ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل) می‌باشد که بعد از انجام واکنش LR، این ژن حذف می‌گردد. پس از انجام واکنش LR و از دست رفتن ژن مقاومت به کلرامفنیکل، برای غربالگری کلون‌های حاوی وکتور بیانی، هر کدام از تک کلون‌های رشد کرده در محیط کشت LB



شکل ۲: الکتروفرز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی NRF2. چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰۰ bp، چاهک ۱ و ۲ (باند ۱۸۲۵ bp ژن NRF2) مربوط به رده سلولی MSC بیمار شده با H_2O_2 می‌باشد. نتایج نشان داد که تغییری در میزان بیان این ژن در بین نمونه‌ها وجود ندارد.

واکنش TOPO® Cloning:

محصول PCR حاصل برای واکنش توپوکلونینگ مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام واکنش، وکتور نوترکیب به باکتری مستعد به روش شیمیایی انتقال داده شد. از آن‌جا که ناقل کلونینگ حاوی ژن مقاومت به کانامایسین بود، باکتری‌های نوترکیب برای غربالگری در محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند. از دو حجم باکتری برای کشت در محیط کشت اختصاصی استفاده شد تا تک کلونی‌های نوترکیب، بهتر قابل



شکل ۳: الکتروفرز پلاسمیدها بر روی ژل آگارز ۱٪. چاهک ۱، ۲ و ۴ تا ۱۲ از کلون‌های حاوی وکتور نوترکیب رشد کرده در محیط اختصاصی کانامایسین و ۲ کلونی ۳ و ۱۳ سبک‌تر بوده که نشان‌دهنده عدم حضور ژن NRF2 در کلونی‌ها می‌باشد.

خطی آدنوویروس به وجود آمد که پس از ترانسفکشن توسط فیوژن ۶ به سلول‌های AD293، آدنوویروس نو ترکیب محتوی NRF2 تولید شد.

در مرحله بعد به منظور استفاده از ویروس برای آلوده سازی سلول‌ها و بیان ژن NRF2 در سلول‌های آلوده شده با ویروس، تعیین میزان غلظتی از ویروس که اولاً باعث سایتوتوکسیسیتی بر روی سلول‌ها نشود و ثانیاً باعث بیان ژن NRF2 درون سلول‌ها شود، سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب pAd/CMV/V5-NRF2 و سلول‌های حاوی pAd/CMV/V5، ضروری بود.

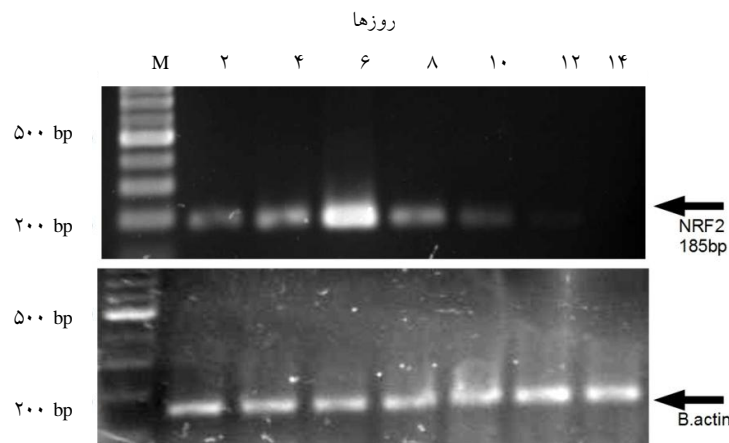
بدین منظور تعداد ذرات ویروسی توسط روش-End Point Dilution Assay که قبلاً توصیف شده است، مشخص گردید (۱۵).

این تعداد در مطالعه حاضر ۵۰۰۰۰۰۰ بود. عدد MOI (Multiplicity of infection) نسبت کل ویروس به سلول می‌باشد که جهت ایجاد عفونت لازم است. در این مطالعه پس از انجام آزمایش در MOI های مختلف، MOI ۱۰۰ جهت انتقال ژن به سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار رفت.

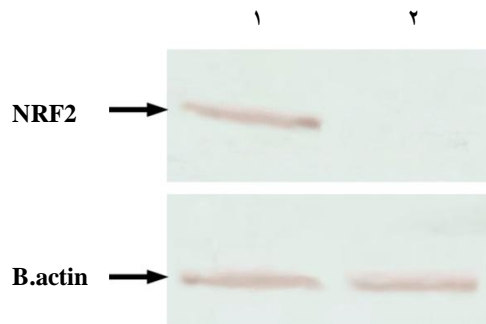
آگار، در محیط کشت LB مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و محیط کشت LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به طور جداگانه کشت داده شدند. ژن NRF2 طی نو ترکیبی و انجام واکنش LR، در ناحیه نو ترکیب جایگزین شد و بنابراین سازه ژنی نو ترکیب حاصل (pAd/CMV/V5-NRF2) بخش ژنی Cm^R را از دست داد و پس از ترانسفورماسیون به باکتری *E. coli*، باکتری‌های مذکور به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل حساس شده و در حضور این آنتی بیوتیک هیچ گونه رشدی از خود نشان ندادند. در صورتی که باکتری‌های ترانسفورم شده با pAd/CMV/V5 (وکتور خالی) به دلیل دارا بودن بخش ژنی Cm^R به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل مقاوم بوده و در حضور آن رشد نمودند.

ساخت آدنو ویروس نو ترکیب و Transduction آن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی به منظور تعیین دوز آدنو ویروس:

پس از تهیه ساختار حلقوی آدنو ویروس نو ترکیب pAd/CMV/V5-NRF2، ابتدا توسط آنزیم Pac1 ساختار



شکل ۴: بررسی بیان موقت NRF2 سلول‌های بنیادی آلوده شده با آدنوویروس محتوی ژن NRF2 با آزمایش RT-PCR. شکل بالا: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن NRF2 بر روی ژل آگارز ۲ درصد. چاهک ۱ (M) مارکر ۱۰۰ bp (۵۰ ng/μl). سایر چاهک‌ها به ترتیب مربوط به نمونه استخراج شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ روز از زمان آلوده شدن آن‌ها با آدنوویروس می‌باشد. شش روز پس از آلودگی ویروسی، بیشترین میزان بیان NRF2 مشاهده شد و پس از ۱۴ روز هیچ بیان افزایش یافته‌ای از NRF2 مشاهده نگردید. شکل پایین: الکتروفورز محصول RT-PCR ژن بتا اکتین بر روی ژل آگارز ۲ درصد. چاهک ۱ (M) مارکر ۱۰۰ bp (۵۰ ng/μl).



شکل ۵: آنالیز بیان پروتئین NRF2 توسط آزمایش وسترن بلائینگ. شکل بالا: در این شکل بیان پروتئین NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنوویروس‌های حاوی ژن NRF2 در مقایسه با کنترل با استفاده از آزمایش وسترن بلائینگ نشان داده شده است. ستون ۱ مربوط به بیان پروتئین NRF2 توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنوویروس‌های حاوی ژن NRF2 است و ستون ۲ بیان آن پروتئین در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنوویروس کنترل را نشان می‌دهد. همان‌طوری که انتظار داشتیم آدنوویروس‌های دارای ژن NRF2، موجب افزایش بیان پروتئین NRF2 گردیدند. شکل پایین: بیان پروتئین بتا اکتین در هر دو نمونه آزمایش و کنترل، در این شکل نشان داده شده است.

که هرکدام ۳ مرتبه تکرار شدند) با استفاده از نرم افزار Image J ویرایش ۱.۴۲ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) همانطوری که قبلاً گفته شده بود، کمی گردیدند (۱۶، ۱۷) (نمودار ۱).

نتایج بیانگر آن بود که سلول بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با NRF2 همانند سلول کنترل می‌تواند به رده استخوانی تمایز یابد و افزایش بیان NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مانع تمایز به سمت رده استخوانی نمی‌گردد.

تمایز سلول‌های مزانشیمی به رده چربی:

پس از آلوده کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با آدنوویروس حاوی NRF2 (و یک دسته نیز با آدنوویروس فاقد NRF2 به عنوان کنترل)، با استفاده از روش‌های ذکر شده، تمایز به رده استخوانی داده شد و پس از ۲۱ روز رنگ آمیزی آلزارین رد صورت گرفت (شکل ۶). فضاهاى مثبت رنگ آمیزی (حداقل در ۵۰ فیلد، در ۳ نمونه مستقل

بررسی بیان موقت ژن NRF2 نو ترکیب با استفاده از RT-PCR:

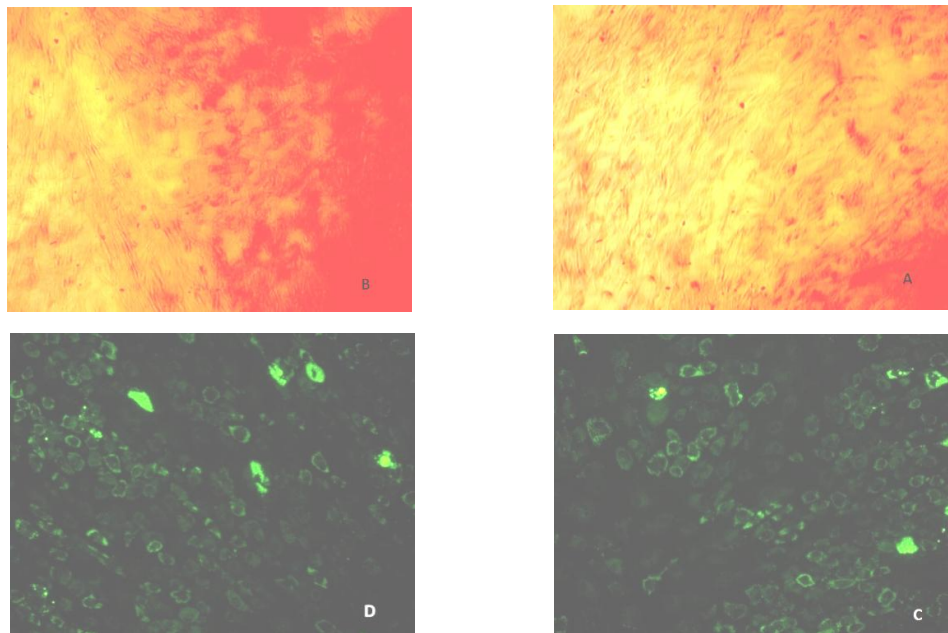
از نمونه‌های RNA استخراج شده در روزهای مختلف از زمان آلوده شدن با آدنو ویروس محتوی ژن NRF2، cDNA ساخته و با آغازگرهای اختصاصی NRF2 انسانی، PCR انجام شد. آغازگر طراحی شده برای ژن NRF2 که در قسمت فوق اشاره شد، توانایی ساخت قطعه‌ای به طول ۱۸۵ جفت بازی را داشت (شکل ۴). در زمان‌های مختلف پس از آلوده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با آدنوویروس محتوی NRF2، آزمایش RT-PCR انجام شد که بر اساس آن بیشترین بیان NRF2 مربوط به روز ششم می‌باشد.

ارزیابی بیان پروتئین NRF2 با استفاده از آزمون وسترن بلائینگ:

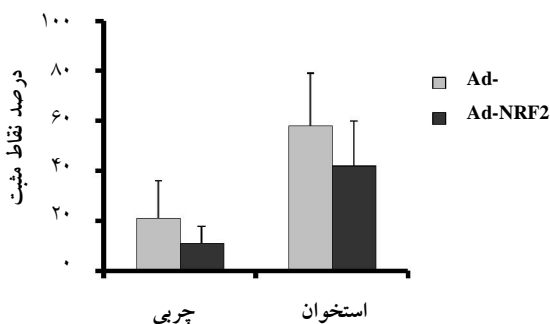
به منظور تایید بیان NRF2 در سلول‌های MSC حاوی ژن NRF2، پس از لیز سلول‌های آلوده شده با ویروس حاوی ژن NRF2 با بافر lysis M، نمونه بر روی ژل الکتروفورز SDS گردید. سپس در مرحله بعد به منظور تایید وجود پروتئین NRF2، با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی مربوط به پروتئین NRF2 و هم چنین آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP، آزمایش وسترن بلائینگ انجام شد. بدین منظور پروتئین موجود در ژل SDS-PAGE بر روی غشای PVDF منتقل گردید و غشا تحت تاثیر آنتی‌بادی‌های اختصاصی NRF2 قرار گرفت. عدم حضور باند در سلول‌های MSC حاوی وکتور خالی (کنترل) و حضور باند در سلول‌های MSC حاوی ژن NRF2، نشان‌دهنده وجود پروتئین NRF2 در سلول‌های آلوده شده با ویروس بود (شکل ۵).

تمایز سلول‌های مزانشیمی به رده استخوانی:

پس از آلوده کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با آدنو ویروس حاوی NRF2 (و یک دسته نیز با آدنو ویروس فاقد NRF2 به عنوان کنترل)، با استفاده از روش‌های ذکر شده، تمایز به رده استخوانی داده شد و پس از ۲۱ روز رنگ آمیزی آلزارین رد صورت گرفت (شکل ۶). فضاهاى مثبت رنگ آمیزی (حداقل در ۵۰ فیلد، در ۳ نمونه مستقل



شکل ۷: تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس‌های حاوی ژن NRF2 در مقایسه با کنترل به سمت رده استخوانی. سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از آلوده شدن با آدنو ویروس‌های کنترل و یا حاوی ژن NRF2، در محیط کشت اختصاصی تمایز استخوانی و چربی کشت داده شدند و سپس رنگ آمیزی اختصاصی گردیدند. پس از تصویربرداری، آنالیز تصاویر توسط نرم افزار image J نشان داد NRF2 تاثیر معناداری بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده استخوانی و چربی ندارد. (A) تمایز سلول‌های مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس محتوی NRF2 به رده استخوانی. (B) تمایز سلول‌های مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس فاقد NRF2 به رده استخوانی. (C) تمایز سلول‌های مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس محتوی NRF2 به رده چربی. (D) تمایز سلول‌های مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس فاقد NRF2 به رده چربی.

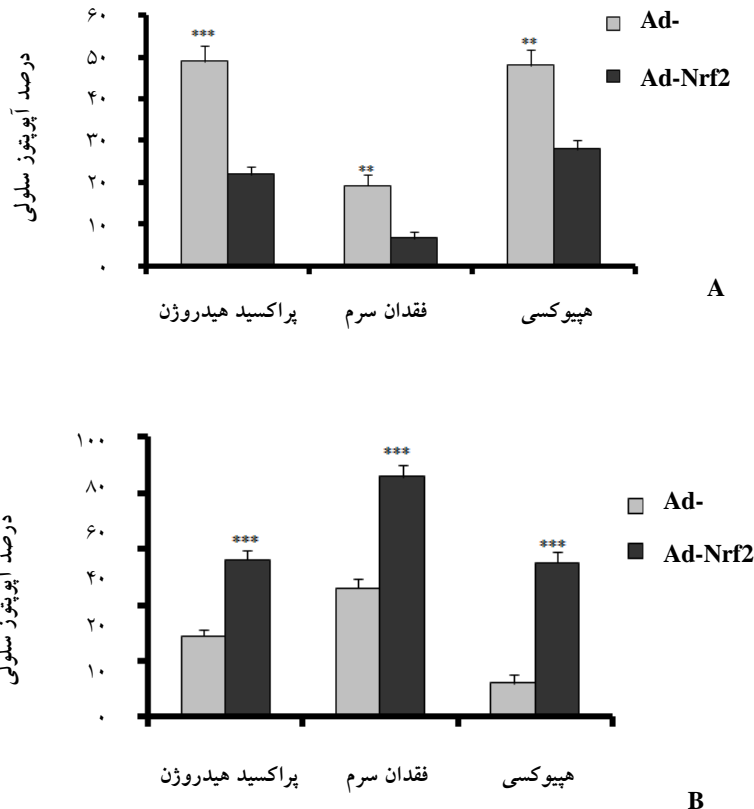


نمودار ۱: تعیین میزان تمایز سلول‌های بنیادی- مزانشیمی به رده‌های چربی و استخوان. پس از آلوده شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی به آدنو ویروس‌های خالی و یا محتوی ژن NRF2، به رده‌های چربی و استخوان تمایز داده شدند. همان طوری که مشاهده می‌گردد، NRF2 تاثیر معناداری در تمایز به سمت رده‌های چربی و استخوان و یا ممانعت از تمایز به این دو رده ندارد.

صورت گرفت، تفاوتی از نظر تمایز به رده چربی در ۲ دسته سلولی دیده نشد. نتایج بیانگر آن است که سلول بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با NRF2 همانند سلول کنترل می‌تواند به رده چربی تمایز یابد (شکل ۷ و نمودار ۱).

بررسی تاثیر دست‌ورزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از آدنو ویروس حاوی ژن NRF2، بر میزان آپوپتوز سلولی:

جهت مطالعه اثر NRF2 بر آپوپتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ابتدا سلول‌های MSC و NRF2-MSC را تحت تاثیر استرس‌های مختلف قرار دادیم. سپس میزان مرگ سلولی با استفاده از کیت آنکسین V اندازه‌گیری گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با ۴۰۰ میکرومولار



نمودار ۲: نمودار A) نمودار بررسی میزان آپوپتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس‌های کنترل و حاوی ژن NRF2 پس از مواجهه با استرس‌های پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، هیپوکسی و فقدان سرم با استفاده از آزمایش آنکسین ۷. نتایج نشان می‌دهد افزایش بیان NRF2 موجب کاهش معنادار میزان آپوپتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از مواجهه با استرس‌های مذکور می‌گردد. نمودار B) بررسی میزان بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با آدنو ویروس محتوی NRF2 در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی دست‌ورزی شده با آدنو ویروس خالی. NRF2 توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را جهت مواجهه با شرایط استرسی هم چون پراکسید هیدروژن ۳ میلی‌مولار به مدت ۲ ساعت، فقدان سرم به مدت ۴۸ ساعت و یا هیپوکسی به مدت ۲۴ ساعت، افزایش می‌دهد و درصد بقای سلولی آن‌ها را افزایش می‌دهد.

جهت نشان دادن تاثیر قدرتمند NRF2 بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پس از مواجهه سلول‌های NRF2-MSC و Ad-MSC با استرس‌های هیپوکسی، فقدان سرم و عوامل اکسیداتیو، سنجش سیتوتوکسیسیته توسط آزمایش MTT انجام شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده شده با آدنو ویروس‌های حاوی NRF2 در برابر ۳ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن به مدت ۲ ساعت، مقاومت بیشتری را از خود نشان دادند.

هم چنین سلول‌های NRF2-MSC در شرایط فقدان سرم به مدت ۴۸ ساعت و یا شرایط هیپوکسی (۱٪ اکسیژن، ۵٪

از پراکسید هیدروژن، سلول‌های دست‌ورزی شده با NRF2 به طور معناداری آپوپتوز کمتری را نشان دادند. هم چنین پس از مواجهه با استرس هیپوکسی (۱٪ اکسیژن) به مدت ۲۴ ساعت و یا شرایط فقدان سرم به مدت ۳ روز نیز به طور معناداری تعداد سلول‌های آپوپتوز شده کاهش یافت (نمودار ۲).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی القا شده با NRF2، در برابر استرس‌های هیپوکسی، فقدان سرم و عوامل اکسیداتیو، مقاومت بیشتری را از خود نشان می‌دهند.

دی اکسید کربن) به مدت ۲۴ ساعت نیز مقاومت بیشتری نسبت به سلول‌های Ad-MSC از خود نشان دادند. تمامی این آزمایش‌ها، تاییدکننده تاثیر حفاظت‌کنندگی شدید NRF2 در برابر استرس‌های مختلف می‌باشد (نمودار ۲).

بحث

امروزه پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اساس سلول درمانی را تشکیل می‌دهد. بیماری‌های مختلفی توسط پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی درمان می‌شوند. مهم‌ترین مساله‌ای که در درمان با این سلول‌ها وجود دارد، مرگ اغلب آن‌ها پس از پیوند می‌باشد. لذا امروزه جهت افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از پیوند تلاش فراوانی می‌شود (۱۸).

از جمله؛ از روش‌های دست‌ورزی ژنتیکی ژن‌هایی که در توانمند نمودن سلول‌ها در برابر استرس‌ها نقش دارند، استفاده می‌کنند. تاکنون از ژن‌های Bcl-2، surviving، CXCR4، FGF-2، Akt، HSP70، HO-1 و ... بدین منظور استفاده کرده‌اند. مهم‌ترین نگرانی که در دست‌ورزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی وجود دارد، تغییر خاصیت تمایزی این سلول‌ها می‌باشد. از آن جایی که مهم‌ترین ویژگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، توانایی آن‌ها در تمایز به رده‌های مختلف است لذا دست‌ورزی ژنتیکی این سلول‌ها زمانی می‌تواند ارزشمند باشد که موجب تغییر خصوصیت فنوتیپی آن‌ها نگردد (۲۶-۱۹). فاکتور نسخه‌برداری NRF2 (Nuclear factor-erythroid-2-related factor) یک فاکتور نسخه‌برداری basic-leucine-zipper می‌باشد که از مدت‌ها پیش به عنوان یک فاکتور حیاتی در حفاظت سلول علیه آسیب‌های اکسیداتیو و الکتروفیل شناخته شده بود. تحت شرایط بدون استرس، NRF2 در سیتوپلاسم به صورت متصل به پروتئین keap1 می‌باشد و پس از نیمه عمر چند ساعته، یوبی کویتینه شده و تجزیه می‌گردد. تحت شرایط استرسی، NRF2 از keap1 جدا شده، نیمه عمر آن افزایش می‌یابد و به هسته منتقل می‌گردد که موجب رونویسی از ژن‌هایی می‌گردند که باعث افزایش مقاومت سلولی در برابر استرس‌های مختلف می‌شوند (۳۰-۳۰).

(۲۷). در این مطالعه از وکتور آدنوویروسی به منظور افزایش بیان NRF2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شد. مطالعه‌ها نشان می‌دهد آلوده شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با وکتورهای آدنو ویروسی و یا رترو ویروسی، بدون تغییر در فنوتیپ، میزان زنده بودن، سرعت تکثیر و ظرفیت تمایز، موجب بیان پروتئین مورد نظر خواهد شد (۱۴). با استفاده از تعیین دوز آدنوویروس، غلظت ۲۰ میکرومولار از ذخیره آدنوویروسی جهت انجام آزمایش‌ها استفاده شد. تاکنون مطالعه‌ای دقیقاً مشابه مطالعه اخیر انجام نشده است. در مطالعه مشابه، لووئن و همکاران از آدنوویروس به منظور انتقال NRF2 به سلول‌های عضله صاف عروقی استفاده کردند و نشان دادند NRF2 در بیماری‌های عروقی که التهاب و استرس اکسیداتیو نقش دارند، می‌تواند کاربرد درمانی داشته باشد (۳۱). در مطالعه دیگری کائو و همکاران از وکتور pIRESneo2/ NRF2 به منظور توانمندسازی سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو استفاده کردند (۳۲).

آدیپوژنیز روند پیچیده‌ای شامل تکثیر پیش‌سازها، تعهد به رده آدیپوژنیک و تمایز نهایی به آدیپوسیت‌های بالغ می‌باشد. مطالعه‌ها نشان دادند فاکتور نسخه‌برداری PPAR γ جهت تمایز به رده چربی لازم و کافی می‌باشد و در صورت فقدان آن، هیچ فاکتور دیگری نمی‌تواند موجب تمایز به رده چربی گردد. مطالعه‌های بعدی نشان دادند فاکتورهای نسخه‌برداری δ & β ، C/EBP α نیز در تمایز به رده چربی نقش دارند. به ویژه C/EBP α نیز در تمایز نهایی به رده چربی بسیار مهم است و در آدیپوسیت‌های بالغ به فراوانی وجود دارد. مطالعه نواحی اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری PPAR γ و C/EBP α نشان داد که این دو فاکتور به محلهایی در کنار هم در طول ژنوم اتصال می‌یابند (colocalization) و این موضوع نشان می‌دهد، این دو فاکتور نسخه‌برداری با هم همکاری دارند و به این ترتیب موجب بیان ژن‌هایی می‌شوند که در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت رده چربی نقش دارند. هنوز مشخص نشده است چگونه عوامل دیگر، اثر فاکتورهای PPAR γ و C/EBP α را در تمایز به سمت رده چربی افزایش و یا کاهش می‌دهند. به عبارت دیگر

استخوانی منجمله استئوکلسین، سیالوپروتئین استخوانی، استئوپونین و کلاژن نوع یک می‌گردد (۳۴). مطالعه ما نشان می‌دهد افزایش بیان فاکتور نسخه‌برداری NRF2، تأثیری در تمایز به رده استخوانی ندارد و به احتمال زیاد تداخلی در فعالیت فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در تمایز به رده استخوانی ایجاد نمی‌کند.

نتیجه‌گیری

آلوده شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با وکتورهای آدنوویروسی، بدون تغییر در فنوتیپ، میزان زنده بودن، سرعت تکثیر و ظرفیت تمایز، موجب بیان پروتئین مورد نظر خواهد شد. این مطالعه نشان می‌دهد افزایش بیان فاکتور نسخه‌برداری NRF2، ضمن ایفای نقش مورد انتظار خود در حفاظت سلول علیه آسیب و مرگ، تأثیری در تمایز به رده استخوانی و چربی ندارد و به احتمال زیاد تداخلی در فعالیت فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در تمایز به این رده‌ها ایجاد نمی‌کند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه ماحصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران می‌باشد.

چگونگی تعامل بین عوامل اثرگذار بر روی تمایز سلول‌های بنیادی و فاکتورهای نسخه‌برداری مذکور هنوز روشن نشده است (۳۳). در این مطالعه نشان داده شد افزایش بیان فاکتور نسخه‌برداری NRF2 که در روند مقاومت سلولی در برابر استرس‌های مختلف محیطی نقش دارد؛ تأثیری در تمایز به سمت رده چربی ندارد. این موضوع نشان می‌دهد NRF2 تعاملی با PPAR γ و C/EBP α ندارد و این ۲ مسیر نسخه‌برداری کاملاً از هم مجزا می‌باشند.

امروزه شناخته شده است که مراحل تعهد، تکثیر و تمایز استئوبلاست‌ها، نیازمند عملکرد هماهنگ و منظم فاکتورهای نسخه‌برداری مخصوصی می‌باشد که مسئول تنظیم تمایز و عملکرد استئوبلاست‌ها می‌باشند. این فاکتورهای نسخه‌برداری شامل Runx2، Osx و ATF4 هستند. از این میان Runx2 نقش حیاتی در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت رده استخوانی ایفا می‌کند. به طوری که اختصاصی‌ترین و حیاتی‌ترین مارکر مولکولی رده استخوانی، از میان فاکتورهای نسخه‌برداری مختلف می‌باشد. بیان Runx2 جهت القای تمایز استخوانی لازم و کافی است که موجب بیان ژن‌های مخصوص رده

References :

- Liu X, Hou J, Shi L, Chen J, Sang J, Hu S, *et al*. Lysophosphatidic acid protects mesenchymal stem cells against ischemia-induced apoptosis in vivo. *Stem Cells Dev* 2009; 18(7): 947-54.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105(1): 93-8.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, *et al*. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103(5): 697-705.
- Pereira RF, Halford KW, O Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, *et al*. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(11): 4857-61.
- Zhang W, Su X, Gao Y, Sun B, Yu Y, Wang X, *et al*. Berberine protects mesenchymal stem cells against hypoxia-induced apoptosis in vitro. *Biol Pharm Bull* 2009; 32(8): 1335-42.
- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, *et al*. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004; 109(12): 1543-9.
- Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, *et al*. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* 2005; 66(3): 543-51.
- Wang J-a, Chen T-l, Jiang J, Shi H, Gui C, Luo R-h, *et al*. Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin* 2008; 29(1): 74-82.
- Yates MS, Tran QT, Dolan PM, Osburn WO, Shin S, McCulloch CC, *et al*. Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis* 2009; 30(6): 1024-31.
- Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem* 2003; 278(14): 12029-38.
- Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, *et al*. Activation of Nrf2- antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(11): 1485-9.

- 12- Reisman SA, Yeager RL, Yamamoto M, Klaassen CD. Increased Nrf2 activation in livers from Keap1-knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species. *Toxicol Sci* 2009; 108(1) : 35-47.
- 13- Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway: Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 2003; 278(10) : 8135-45.
- 14- Roelants V, Labar D, de Meester C, Havaux X, Tabilio A, Gambhir SS, *et al.* Comparison between adenoviral and retroviral vectors for the transduction of the thymidine kinase PET reporter gene in rat mesenchymal stem cells. *J Nucl Med* 2008; 49(11): 1836-44.
- 15- Weng Q, Yang K, Xiao W, Yuan M, Zhang W, Pang Y. Establishment of an insect cell clone that harbours a partial baculoviral genome and is resistant to homologous virus infection. *J Gen Virol* 2009; 90(pt 12): 2871-6.
- 16- Kamiya N, Watanabe H, Habuchi H, Takagi H, Shinomura T, Shimizu K, *et al.* Versican/PG-M regulates chondrogenesis as an extracellular matrix molecule crucial for mesenchymal condensation. *J Biol Chem* 2006; 281(4): 2390-400.
- 17- Hu G, Liu P, Feng J, Jin Y. A novel population of mesenchymal progenitors with hematopoietic potential originated from CD14 peripheral blood mononuclear cells. *Int J Med Sci* 2010; 8(1): 16-29.
- 18- Gui C, Wang JA, He AN, Chen TL, Luo RH, Jiang J, *et al.* Heregulin protects mesenchymal stem cells from serum deprivation and hypoxia-induced apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2007; 305(1-2): 171-8.
- 19- Wagner J, Kean T, Young R, Dennis JE, Caplan AI. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20(5): 531-6.
- 20- Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, *et al.* Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells* 2007; 25(8): 2118-27.
- 21- Fan L, Lin C, Zhuo S, Chen L, Liu N, Luo Y, *et al.* Transplantation with survivin-engineered mesenchymal stem cells results in better prognosis in a rat model of myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 2009; 11(11): 1023-30.
- 22- Noiseux N, Gnecci M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, *et al.* Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther* 2006; 14(6) : 840-50.
- 23- Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(7): 1339-50.
- 24- Zeng B, Ren X, Lin G, Zhu C, Chen H, Yin J, *et al.* Paracrine action of HO-1-modified mesenchymal stem cells mediates cardiac protection and functional improvement. *Cell Biol Int* 2008; 32(10): 1256-64.
- 25- Bhakta S, Hong P, Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 *in vitro* but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovasc Revasc Med* 2006; 7(1): 19-24.
- 26- Song H, Kwon K, Lim S, Kang SM, Ko YG, Xu Z, *et al.* Transfection of mesenchymal stem cells with the FGF-2 gene improves their survival under hypoxic conditions. *Mol Cells* 2005; 19(3): 402-7.
- 27- Jin W, Wang H, Ji Y, Zhu L, Yan W, Qiao L, *et al.* Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to acute lung injury after traumatic brain injury in mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234(2): 181-9.
- 28- Lee JM, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 2004; 37(2): 139-43.
- 29- Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V, Nilles T, Biswal S, Trush MA, *et al.* Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. *Arch Biochem Biophys* 2006; 454(1): 7-15.
- 30- Homma S, Ishii Y, Morishima Y, Yamadori T, Matsuno Y, Haraguchi N, *et al.* Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(10): 3423-32.
- 31- Levonen AL, Inkala M, Heikura T, Jauhiainen S, Jyrkkanen HK, Kansanen E, *et al.* Nrf2 gene transfer induces antioxidant enzymes and suppresses smooth muscle cell growth in vitro and reduces oxidative stress in rabbit aorta in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(4): 741-7.
- 32- Cao TT, Ma L, Kandpal G, Warren L, Hess JF, Seabrook GR. Increased nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 activity protects SH-SY5Y cells against oxidative damage. *J Neurochem* 2005; 95(2): 406-17.
- 33- Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20(3): 107-14.
- 34- Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473(2): 98-105.

*Original Article***Infection of MSCs by adenovirus expression system expressing NRF2 as a cytoprotective factor**

Mohammadzadeh M.¹, Halabian R.¹, Mohammadipoor M.¹, Kiani AA.², Gharehbaghian A.³, Amirizadeh N.¹, Habibi Roudkenar M.¹

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Lorestan University of Medical Sciences, Lorestan, Iran

³Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract**Background and Objectives**

Poor viability of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) following transplantation is one of the major challenges in their therapeutic application. Manipulation of MSCs by the genetic engineering method is one of the strategies used to protect the cells against cytotoxic microenvironment. However, maintaining multi differentiation capacity of MSCs following manipulation is important. We investigated if the manipulation of MSCs with NRF2 affects the multi differentiation capacity.

Materials and Methods

MSCs were isolated from bone marrow. NRF2 was isolated and TOPO cloned into the pENTR vector. The recombinant vector was transferred into pAD/CMV/V5-DEST vector by gateway technology. Recombinant adenovirus was produced in AD293 cells, followed by being infected into MSCs. Expression of NRF2 was verified by RT-PCR. The NRF2 engineered MSCs were exposed to stress conditions followed by the evaluation of the cells viability and apoptosis. Finally, NRF2 expressing MSCs differentiation into osteoblast and adipocyte lineages was studied.

Results

NRF2 was successfully expressed in MSCs. NRF2- MSCs differentiation into osteoblast and adipocyte lineages indicating overexpression of NRF2 does not affect the differentiation property of MSCs.

Conclusions

Expression of NRF2, a well known cytoprotective factor, by using adenovirus expression system does not intervene in the differentiation capacity of MSCs. NRF2-MSCs might be applicable for stem cell-based cell therapy in future.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Nrf2 Protein, TOPO

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; 8(4):

Received: 12 Mar 2011

Accepted: 5 Sep 2011

Correspondence: Habibi Roudkenar M., PhD of Biotechnology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599; Fax: (+9821)88601599
E-mail: roudkenar@ibto.ir